

**BEST AVAILABLE COPY**

PCT/FR 2004/001678

REC'D 04 OCT 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 JUL. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous Informer : INPI DIRECT

☎ **INPI Direct 0 825 83 85 87**

0,19 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 030103

### REMISE DES PIÈCES

DATE

**4 JUIL 2003**

LIEU

**75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

**0308186**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

**- 4 JUIL. 2003**

PAR L'INPI

### 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE**

### Vos références pour ce dossier

(facultatif)

**240034 D20600 IW**

### Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

### 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*

N°

Date

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

### 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

**PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN EVENEMENT MOLECULAIRE DANS UNE CELLULE GRACE A DES  
PROTEINES MARQUEURS FLUORESCENTES.**

### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE  
(INSERM)**

**180036048**

Domicile  
ou  
siège

Rue

**101, rue de Tolbiac 75013 PARIS**

Code postal et ville

Pays

**FRANCE**

Française

N° de télécopie (facultatif)



Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>4 JUIL 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0308186</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 030103
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom <b>240034 JW</b> Prénom Cabinet ou Société <b>Cabinet REGIMBEAU</b> N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue <b>20, rue de Chazelles</b> Code postal et ville <b>75847 PARIS CEDEX 17</b> Pays N° de téléphone (facultatif) <b>01 44 29 35 00</b> N° de télécopie (facultatif) <b>01 44 29 35 99</b> Adresse électronique (facultatif) <b>info@regimbeau.fr</b>			
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : <b>Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</b>			
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG			
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint <input checked="" type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe <input checked="" type="checkbox"/> Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) 		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La présente invention concerne un procédé de mise en évidence d'un évènement moléculaire particulier tel que l'apoptose dans une cellule vivante.

5 La mise en évidence d'un évènement moléculaire particulier tel que l'apoptose dans une cellule vivante met habituellement en oeuvre un certain nombre de techniques telles que la détection par "Western blot" ou immunofluorescence de protéines marqueurs telles que la protéine Bax ou les caspases activées qui sont impliquées dans les phénomènes d'apoptose.

10 Dans le cas des caspases, par exemples, les méthodes pour mesurer l'activation de ces protéines dans les cellules sont pour l'essentiel assez complexes et assez longues de mise en oeuvre.

Ainsi, dans la méthode "Western Blot", qui est la méthode habituelle d'observation de l'activation des caspases, on utilise les anticorps dirigés contre les protéines qui sont substrats des caspases (Parp, caspase elle-même), et on détecte 15 l'apparition des bandes de poids moléculaire correspondant au produit de protéolyse correspondant.

La technique est laborieuse, implique de nombreuses étapes préparatives et ne permet de mesurer l'activation des caspases que sur une population cellulaire et non pas sur les cellules individuelles.

20 La technique d'immunofluorescence met en oeuvre des anticorps qui reconnaissent de façon spécifique la forme active de la caspase et qui peuvent être utilisés pour la détecter au niveau unicellulaire sur des cellules fixées. Cette technique permet la détection sur cellules individuelles mais elle est laborieuse et implique de nombreuses étapes préparatives.

25 On utilise également des techniques mettant en oeuvre des sondes fluorescentes chimiques. Il en existe différents types dans le commerce, en général il s'agit des produits chimiques qui ont une forte affinité pour le site actif de la protéase et qui émettent un signal fluorescent une fois fixés à la caspase. Ces sondes sont capables de pénétrer dans les cellules et peuvent permettre la mesure de l'activité des 30 caspases par microscopie en fluorescence et/ou par cytométrie. Toutefois, leur limite est liée au protocole de charge et au coût qui empêche leur utilisation pour des tests à moyen ou à haut débit.

Enfin, les sondes recombinantes basées sur la technologie FRET qui utilisent des sondes obtenues par génie génétique que l'on peut introduire dans les cellules par

transfection transitoire ou stable. Ces sondes sont constituées par des protéines fluorescentes (qui sont des mutants spectraux de la GFP) et le signal détecté est donné par le phénomène de transfert d'énergie de fluorescence. Le principe est que deux GFP mutants fusionnés en tandem et séparés par un linker contenant la séquence de clivage de la sonde donne un signal de transfert fluorescent (émission de la molécule accepteuse par excitation de la molécule donneuse car interagissant entre elles). Si la caspase coupe le linker, les deux protéines s'éloignent et le signal disparaît.

Ces sondes ont fait l'objet de quelques publications récentes mais la difficulté est de détecter le signal Fret (la nécessité d'utiliser des filtres adaptés en microscopie et en cytométrie en limite l'usage).

Le procédé selon la présente invention a pour objet la détection d'évènements moléculaires particuliers dans une cellule sans utiliser les technologies précédentes mais en pouvant utiliser la microscopie et la cytométrie sans que cela nécessite des préparations longues ou l'utilisation de réactifs particulièrement coûteux.

En effet, comme on le constatera, le procédé selon la présente invention ne nécessite aucune préparation compliquée d'échantillon.

Le coût est très faible puisque la sonde peut être fabriquée par la cellule elle-même et la mesure peut être faite sur cellule unique par microscopie à fluorescence ou en cytométrie de flux.

Il est possible de fabriquer des animaux transgéniques avec ce type de technologie et on a la possibilité d'effectuer des transferts de ce test sur des microplaques afin de créer des plateformes à haut débit.

Le procédé de mise en évidence de la survenue d'un évènement moléculaire particulier dans une cellule selon la présente invention est caractérisé en ce que :

- on détecte la "solubilisation" d'une protéine marqueur "fixée" (respectivement la "fixation" d'une protéine marqueur "solubilisée") qui est un marqueur direct ou indirect de la survenue de l'évènement moléculaire particulier,
- laquelle protéine marqueur est présente dans la cellule avant la détection précédente,
- la cellule étant, avant la détection, soumise à une perméabilisation de la membrane plasmique qui libère la protéine solubilisée dans le milieu extracellulaire,

- la présence de la protéine marqueur étant alors détectée dans la cellule ou le milieu extracellulaire par tout moyen approprié, ce qui permet de déterminer si la solubilisation, respectivement la fixation, ont eu lieu et donc l'évènement moléculaire correspondant.

5 La protéine marqueur est la plupart du temps constituée d'une composante sensible qui subira la solubilisation (ou la fixation) et d'une composante indicateur permettant la détection. Comme on le verra, il s'agit souvent d'une protéine fluorescente.

10 La composante sensible peut être une protéine qui est liée directement avec l'évènement moléculaire que l'on souhaite observer, c'est-à-dire que c'est précisément sa solubilisation ou sa fixation qui constitue l'évènement moléculaire que l'on veut mesurer, ou bien elle peut être une protéine liée indirectement à l'évènement moléculaire à mesurer et susceptible de subir une solubilisation ou une fixation suite à l'induction de cet évènement moléculaire ; c'est le cas, par exemple, de la protéolyse induite par les caspases lors de l'apoptose.

En tout état de cause, la protéine composante sensible doit subir une solubilisation, respectivement une fixation, lorsque l'évènement moléculaire se produit.

On entend, dans la présente description, désigner par "fixation" d'une protéine, l'ancrage membranaire ou la compartimentation au niveau subcellulaire de ladite protéine de façon telle que la protéine ne puisse diffuser dans le milieu extracellulaire lors de la perméabilisation de la cellule. De même, par "solubilisation" cellulaire de la protéine on entend désigner la présence de la protéine marqueur sous forme de protéine libre dans le cytosol cellulaire, de façon telle que la protéine puisse diffuser dans le milieu extérieur lors de la perméabilisation de la cellule.

25 Lorsque l'on réalise la perméabilisation sélective de la membrane plasmique, si la protéine marqueur est fixée, c'est-à-dire si elle est ancrée sur une membrane compartimentée, elle va rester fixée dans la cellule et ne va pas passer dans le milieu extracellulaire ; au contraire, si la protéine est soluble, c'est-à-dire présente dans le cytosol, elle va migrer dans le milieu extracellulaire, dans ces conditions on observera dans le premier cas une cellule marquée et dans le second cas une cellule non marquée.

30 Le marquage de la cellule étant de préférence un marquage par fluorescence, il est alors aisé de détecter par microscopie de fluorescence ou par cytométrie les cellules marquées et non marquées. Ceci ne nécessite pas de préparation de l'échantillon, à l'exception de la perméation.

Il est théoriquement possible d'utiliser d'autres types de marquage qui permettraient de distinguer la présence de la protéine marqueur dans la cellule ou, au contraire, son absence, mais il est certain que compte tenu du développement des techniques de fluorescence, c'est cette technique qui sera préférée.

5 La perméabilisation sélective de la membrane plasmique aboutit donc, dans une population cellulaire exprimant de façon homogène le marquage et à la discrimination des cellules dans lesquelles l'évènement moléculaire a eu lieu car le signal fluorescent sera maintenu (ou respectivement perdu) spécifiquement dans cette sous population cellulaire.

10 L'analyse par cytométrie en flux permet d'évaluer de façon quantitative le pourcentage de la population cellulaire dans laquelle l'évènement moléculaire mesuré a eu lieu et fournit un test simple pour évaluer l'effet activateur ou inhibiteur des drogues qui interagissent avec ledit évènement moléculaire.

15 L'approche décrite ici ne nécessite qu'une manipulation expérimentale très réduite (pas de fractionnement, pas de procédures de fixation et d'incubation avec anticorps, pas d'électrophorèse, pas de microscopie). Le temps cumulé de récupération des cellules, de perméabilisation, et d'analyse est inférieur à 30 minutes (plusieurs heures voire jours pour les autres techniques).

20 Elle permet la mesure du paramètre d'intérêt au sein même de la cellule sans induire d'artefacts liés au fractionnement (WB) ou à la fixation et à l'utilisation de détergents à doses élevées (immunofluorescence).

Enfin, cette technique présente un coût expérimental minime (pas de réactifs, pas d'anticorps).

25 La protéine marqueur peut être produite transitoirement dans la cellule grâce à un vecteur d'expression de ladite protéine, mais il est possible également de prévoir l'expression constitutive de cette protéine marqueur dans des lignées cellulaires ou des animaux transgéniques qui pourront ainsi devenir des outils de détection de l'évènement moléculaire. Dans le cas de l'apoptose par exemple, ces outils permettront de tester les produits ayant des propriétés pro ou anti-apoptotiques sans avoir à réaliser  
30 les transfections par des vecteurs appropriés à chaque essai.

La technique permettant l'expression d'une protéine marqueur est connue dans la technique antérieure, les plasmides ou vecteurs utilisables dépendront, bien entendu, de la cellule, de même que les promoteurs et les différents éléments de régulation de l'expression.

De même, les techniques permettant l'expression constitutive d'une protéine marqueur sont connues, elles consistent à introduire dans l'un des chromosomes de la cellule un système d'expression stable ou inductible de la protéine marqueur par des méthodes de type recombinaison, par exemple.

5 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la protéine marqueur est constituée par une protéine de fusion comportant :

- une protéine sensible proprement dite qui subit une solubilisation, respectivement une fixation, lors de la survenue de l'évènement moléculaire,
  - un fragment fluorescent, notamment une protéine fluorescente : "green fluorescent protein", "red fluorescent protein" ou toute molécule qui en dérive ou
- 10 qui possède des propriétés similaires de fluorescence.

Dans les exemples on a utilisé les protéines GFP et DsRed2 mais on peut utiliser d'autres protéines telles que les mutants spectraux des protéines précédentes.

On peut, de façon générale, considérer que les protéines marqueurs seront

15 de deux types, un premier dans lequel la composante sensible est constituée par l'élément protéique qui subit la solubilisation ou la fixation, cet évènement moléculaire étant ce que l'on veut directement mesurer. C'est le cas par exemple de Bax, comme cela sera décrit plus complètement ci-après. Dans l'autre type de protéine marqueur, la composante sensible peut être un fragment protéique qui est solubilisé ou fixé suite à

20 l'interaction avec la protéine qui subit l'évènement moléculaire que l'on veut mesurer. C'est le cas, par exemple, de l'activation des caspases : la protéine marqueur sera une protéine de fusion comportant le site de clivage de la protéase et, de part et d'autre de ce site de clivage, un site d'ancrage à la membrane et une protéine fluorescente, ainsi

25 lors de l'activation de la protéase, la composante indicateur, c'est-à-dire la protéine fluorescente, sera solubilisée par clivage.

Dans ce dernier cas, la protéine d'ancrage pourra être choisie de façon générale parmi les domaines transmembranaires connus, il pourra s'agir notamment d'un domaine transmembranaire exogène fusionné à l'extrémité de la protéine fluorescente par l'intermédiaire d'un linker qui comportera le site de clivage de la

30 protéase.

Dans ce qui va suivre et dans les exemples, le domaine transmembranaire qui a été testé est un court domaine C-terminal présent dans la classe de protéines dite "TA protéine" (Tail Anchored proteins). Il a été conféré à cette portion transmembranaire une spécificité mitochondriale par mutation mais il est possible



d'utiliser d'autres cassettes protéiques d'ancrage de la membrane, par exemple le domaine transmembranaire à l'N-terminal, séquence de myristilation ou de palmitoylation par exemple, ou adressé à d'autres membranes (membrane plasmique, membrane du reticulum endothélien, Golgi par exemple), pourvu que la partie  
5 fluorescente reste exposée dans le cytosol.

La technique peut être appliquée à des protéines naturellement dotées de cette propriété ou à des protéines artificiellement construites à ces fins.

La présente invention concerne donc un procédé de mise en évidence de la survenue d'un évènement moléculaire particulier et ceci en utilisant une protéine  
10 marqueur.

Mais la présente invention concerne également :

- les protéines marqueurs utiles dans la mise en oeuvre de ce procédé et qui comportent un composant sensible qui subira la solubilisation (la fixation) et un composant indicateur qui permettra la détection, il s'agira de préférence d'une  
15 protéine de fusion où le composant indicateur est une protéine fluorescente, comme cela a été mentionné précédemment.

L'invention concerne également :

- les vecteurs exprimant, dans un environnement cellulaire approprié, une protéine marqueur,
- 20 - les cellules transformées exprimant une protéine marqueur de façon stable ou transitoire.

L'invention concerne des animaux transgéniques dont au moins certains types de cellules expriment une protéine marqueur.

Enfin, l'invention concerne un kit de mise en oeuvre du procédé selon l'un  
25 des modes de réalisation précédent, comportant :

- des cellules transformées
- un vecteur ou un animal transgénique tel que mentionné précédemment.

Une cellule eucaryote exploite différentes stratégies pour activer de manière appropriée les voies de transduction du signal en réponse aux stimuli  
30 spécifiques. Outre au contrôle de type transcriptionnel (la molécule active est synthétisée de novo) ou post-traductionnelle (la molécule signal déjà présente subit une modification qui la rend active (par exemple une protéolyse ou une phosphorylation) ou par interaction protéine-protéine, la cellule dans certains cas met en place une stratégie de compartimentalisation : la molécule active est déjà exprimée dans la

cellule, mais elle est piégée dans un compartiment subcellulaire où elle ne peut pas exercer son activité (ex. libération de facteurs pro-apoptotiques de la matrice mitochondriale, recrutement de facteur à la membrane plasmique).

Dans certains cas, ce type de stratégie comporte non seulement un  
 5 changement de distribution intracellulaire mais aussi un changement de solubilité de la protéine qui peut être sous forme cytosolique soluble dans sa forme inactive et membranaire dans sa forme active, ou vice versa (ex. protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, facteurs de transcription activés par le réticulum endoplasmique). Ce type d'évènement peut être donc mis en évidence par microscopie et par cytométrie en  
 10 flux grâce à la construction d'une protéine de fusion avec une protéine fluorescente (voir exemple ci-dessous : sonde pour mesurer l'activation de Bax).

De la même manière il est possible d'appliquer ce type d'approche à l'utilisation de protéines marqueurs auxquelles a été donnée artificiellement la propriété de changer de phase par rapport au signal à mesurer : en particulier on peut  
 15 construire des protéines marqueurs recombinants pour mesurer l'activité des protéases intracellulaires : dans ces protéines marqueurs la protéine fluorescente est accrochée à une membrane intracellulaire par fusion à un domaine transmembranaire par le biais d'une séquence linker qui contient le site de clivage de la protéase dont on veut mesurer l'activité : c'est ce type d'approche qui a été retenu avec la sonde à caspase 3  
 20 décrite dans les exemples.

L'étape de perméabilisation n'est pas en théorie indispensable, en effet il est possible par microscopie à fluorescence par exemple de détecter la présence de la fluorescence, soit dans le cytosol, soit sur les membranes ou dans les compartiments dans lesquels elle est fixée, toutefois la perméabilisation des cellules permet une  
 25 automatisation du processus et constitue le mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention.

Afin de permettre le relargage sous forme soluble dans le milieu extracellulaire de la protéine marqueur fluorescente, on peut utiliser toutes les technologies appropriées et connues de l'homme du métier, on préférera utiliser  
 30 notamment la perméabilisation à la digitonine à des concentrations comprises entre 1 et 100  $\mu\text{M/ml}$  et de préférence 5 à 50  $\mu\text{M/ml}$ , mais il est également possible d'utiliser d'autres détergents tels que les saponines à très faibles doses par exemple à 0,5 à 10  $\mu\text{M/ml}$ , de préférence de l'ordre de 1  $\mu\text{M}$ ., la streptolysine 0 (20-500 ng/ml) ou des cycles de congélation/décongélation.

Ceci permet de faire une détection, par exemple en cytométrie en flux qui est évidemment beaucoup plus sensible et automatisable que les autres techniques, même si celles-ci sont également utilisables, par exemple un lecteur de microplaques, un microscope à fluorescence ou un microscope confocal par exemple.

5 Les procédés selon la présente invention sont intéressants dans la mise en évidence d'un grand nombre de phénomènes moléculaires mais en particulier dans l'étude des propriétés anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques de molécules destinées à être utilisées comme médicaments.

10 L'apoptose est un processus de mort cellulaire très conservé et régulé, constitué par une cascade d'évènements moléculaires qui entraînent la cellule vers la dégradation et la mort (1). Les dysfonctionnements de l'apoptose sont à l'origine de nombreux cancers (défaut d'apoptose) et sont aussi impliqués dans la pathogénie des processus neurodégénératifs (excès d'apoptose) (1).

15 La phase finale de l'apoptose est constituée par la dégradation des structures cellulaires, d'une part par l'effet de l'activation d'une classe spécifique de «cystéine protéases», les caspases, d'autre part par l'activation d'endonucléases qui dégradent la chromatine nucléaire (1).

20 Une cellule qui subit le processus de mort cellulaire programmée est caractérisée par des nombreux signes morphologiques et biochimiques plus ou moins spécifiques. Certaines modifications morphologiques peu spécifiques sont facilement détectables par simple observation en microscopie optique telles la condensation cellulaire, la formation de « blebs » sur la membrane plasmique, ou l'apparition d'une perméabilité de cette dernière à l'iodure de propidium. Certains colorants nucléaires (Hoechst, Dapi) qui révèlent la morphologie du noyau, permettent de visualiser la  
25 dégradation/condensation de la chromatine. Ce dernier paramètre est également détectable par électrophorèse du matériel génomique d'une population cellulaire avec apparition de l'aspect typique en « barreaux d'échelle » (DNA ladder), et au niveau unicellulaire par microscopie et cytométrie en flux grâce au principe du TUNEL, marquage colorimétrique ou fluorescent titrant la quantité d'extrémités libres de DNA  
30 produites par l'action des endonucléases apoptotiques. Parmi les autres signes généralement mesurés on compte : l'activation des caspases (Western Blot, cytométrie en flux), la protéolyse des substrats des caspases activées (Western Blot), et l'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique (cytométrie en flux).

En amont des processus décrits il existe différentes voies de signalisation intracellulaire qui poussent la cellule à s'engager dans un processus d'autodestruction (c'est l'initiation de l'apoptose) : ces stimuli d'induction apoptotique sont divers, et les cascades de signalisation intracellulaire qui leur correspondent peuvent varier selon le stimulus inducteur et/ou le modèle cellulaire.

Certains de ces événements moléculaires précoces représentent des étapes clefs pro-apoptotiques, et la possibilité de les détecter spécifiquement avec une bonne sensibilité ouvre par exemple la voie au screening de composés actifs anti- ou pro-apoptotiques.

La relocalisation de la protéine Bax du cytosol à la membrane des mitochondries est un événement précoce et générique lors de la signalisation de l'apoptose (2). La relocalisation de Bax, suivie d'une homo-oligomérisation, est la cause de la libération du cytochrome c qui entraîne sans possibilité de retour la mort de la cellule en provoquant l'activation de la caspase 9, puis celle de la caspase 3 (2). Bax est une protéine cytosolique globulaire dont la structure primaire lui permet d'être classée dans la famille des Bcl-2. Les travaux de Youle (2) ont largement contribué à la compréhension du rôle joué par les différents domaines de Bax dans sa relocalisation et sa redistribution, cependant sa structure secondaire était inconnue jusqu'à l'étude de Tjandra qui a permis son élucidation par résonance magnétique nucléaire (RMN) (2). La conformation du domaine C-terminal de Bax, constitué de l'hélice  $\alpha 9$  comportant 22 résidus s'est avérée d'une importance majeure. Dans la forme soluble cytosolique de la protéine, cette hélice repose dans une cavité hydrophobe et la relocalisation dépend d'un changement conformationnel de Bax qui expose l'hélice hors de la poche hydrophobe : le domaine C-terminal de Bax «exposé» possède alors un tropisme pour la membrane mitochondriale. C'est ce changement de conformation qui peut être mis en évidence par le procédé selon l'invention, comme cela sera décrit dans les exemples.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après et en se reportant aux figures annexées sur lesquelles :

- la figure 1 représente une microscopie à fluorescence d'un clone cellulaire humain (clone 10) obtenu à partir d'une lignée HeLa qui exprime de façon stable la protéine chimérique GFP-Bax à T = 0 et T = 300 s sans perméabilisation et avec perméabilisation à la digitonine et les courbes correspondant aux points a, b et c ;

- les figures 2, A, B et C, montrent des profils de fluorescence de la population de clone 10 dans diverses conditions (voir exemples) ;
- les figures 3, A et B, représentent la variation d'activation de Bax dans diverses conditions (voir exemples) ;
- 5 - la figure 4 représente un histogramme de l'activation de Bax dans diverses conditions (voir exemples) ;
- la figure 5 représente le plasmide pEGFP-Bax.
- la figure 6 représente la quantification de la caspase 3.

#### EXEMPLE 1 - ACTIVATION DE LA PROTEINE BAX

10 L'exemple ci-après décrit un test simple permettant de détecter les changements conformationnels de la protéine Bax lors de l'induction de l'apoptose .

Comme cela a été indiqué précédemment, dans une cellule normale Bax est repliée de façon telle que son extrémité C-terminale très hydrophobe est protégée par le reste de la molécule (2). Au cours de l'induction de l'apoptose, la protéine subit un  
15 changement conformationnel qui modifie ses propriétés, l'exposition de son extrémité C-terminale induisant une relocalisation mitochondriale de Bax. Dans cette forme Bax se comporte comme une protéine membranaire insérée de façon stable dans la membrane externe mitochondriale.

L'utilisation d'une protéine chimérique obtenue par la fusion de la GFP à l'extrémité N-terminale de Bax fournit une sonde recombinante fluorescente indiquant la localisation de Bax.  
20

La protéine chimérique garde les mêmes propriétés que la protéine native et en particulier la capacité de subir la modification conformationnelle et la relocalisation à la mitochondrie lors de l'induction de l'apoptose.

25 Le modèle mis en oeuvre utilise un clone dit "clone 10".

Il s'agit de cellules HeLa (tumeur du col de l'utérus humain) qui ont été transfectées par la technique du calcium phosphate avec un plasmide pEGFP-Bax codant pour la protéine chimérique de fusion GFP-Bax sous le contrôle du promoteur viral CMV et qui confère une résistance à la généticine.

30 Le vecteur de base utilisé est un vecteur commercial PEGFP-C3 (Figure 5) de la société Clontech dans lequel on insère, sous le contrôle du promoteur CMV, l'ADNc de Bax fusionné en phase à son extrémité 5' à l'ADNc de la GFP privé de son codon stop.

Quatre jours après la transfection, les cellules sont exposées à une concentration de 1 mg/ml de généticine G418 qui est progressivement réduite à 0,1 mg/ml au cours de la semaine suivante. Après 2 semaines, on isole un certain nombre de clones résistants à la généticine que l'on sélectionne au microscope à fluorescence;

Le clone 10 contient un pourcentage élevé de cellules uniformément fluorescentes au niveau cytosolique et ce marquage est stable dans le temps, environ 10 passages). Les cellules sont maintenues en culture en DMEM 10% FCS, 0,1 mg/ml de généticine.

Le test repose alors sur l'observation au microscope à fluorescence ou en cytométrie de flux des cellules dans lesquelles Bax n'est pas activée et est donc répartie uniformément dans le cytosol et des cellules dans lesquelles Bax ayant été activée à la suite d'une induction d'apoptose le signal fluorescent est agrégé autour des mitochondries, la protéine Bax étant alors dite "fixée".

Pour mettre en évidence la fixation ou la solubilisation de Bax, on traite la population contrôle et la population traitée avec l'agent apoptotique par de la trypsine afin de les détacher de leur boîte de culture. Les cellules sont ensuite resuspendues dans une solution saline intracellulaire en présence de 50  $\mu$ M de digitonine, les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux et la fluorescence de la GFP est mesurée dans le canal FL1.

Des cellules ainsi traitées sont représentées à la figure 1 et montrent qu'on observe une chute d'intensité de fluorescence très forte dans les cellules pour lesquelles Bax n'a pas été activée, l'image étant tout d'abord uniformément fluorescente puis cette fluorescence ayant quasiment disparue au bout de 300 secondes.

Au contraire, lorsque Bax a été activée, on constate que la fluorescence est redistribuée aux mitochondries et résiste à la perméabilisation, comme cela ressort des mesures quantitatives effectuées dans les courbes correspondantes.

La figure 2 montre différents profils de fluorescence en FL1 de la population clone 10 avec ou sans perméabilisation et en présence de différents agents pro-apoptotiques.

"A" montre le profil de fluorescence de la population clone 10 contrôle avec ou sans perméabilisation. Comme l'indique le déplacement du pic de distribution vers la gauche, le signal fluorescent est sensible au traitement à la digitonine.

"B" montre le profil cytométrique en FL1 d'une population traitée par un agent pro-apoptotique (selenite 20  $\mu$ M, 6 h) activant Bax. En comparant les profils obtenus avec ou sans inducteur et après perméabilisation, on peut observer que sous inducteur apoptotique le signal fluorescent est devenu résistant au traitement de perméabilisation.

En "C", la même différence est observée sous induction de l'apoptose par staurosporine (1  $\mu$ M, 6 h) ou TNF $\alpha$  (10 ng/ml, 6 h + CHX 10  $\mu$ M).

#### EXEMPLE 2 - QUANTIFICATION DE LA RELOCALISATION DE BAX A LA MITOCHONDRIE SOUS INDUCTION APOPTOTIQUE

La technique permet d'évaluer l'induction de Bax en mesurant le pourcentage de cellules dans lesquelles la relocalisation de Bax à la mitochondrie a eu lieu.

Avec cette approche, il est possible :

- d'analyser si l'expression d'un gène induit ou non l'activation de Bax et
- d'évaluer de façon quantitative le pouvoir pro-apoptotique ou cytoprotecteur d'une drogue.

Pour évaluer le pouvoir d'activation de Bax d'un gène exogène, le clone 10 est transfecté avec l'ADNc de la protéine d'intérêt en association avec un autre ADNc codant pour un marqueur fluorescent spectralement différentiable de la GFP et ayant une localisation subcellulaire, membranaire ou compartimentée (résistant à la perméabilisation), par exemple la DsRed adressée à la matrice mitochondriale (mtDsRed). Dans ce dernier cas, après perméabilisation, l'intensité de fluorescence enregistrée dans le canal FL1 (GFP) donne toujours l'indication du niveau d'activation de Bax, tandis que l'intensité du signal en FL3 (DsRed) indique si la cellule surexprime ou non la protéine d'intérêt.

En pratiquant une mesure biparamétrique sur clone 10, il est donc possible de corréler l'activation de Bax à la surexpression d'une protéine d'intérêt.

Les résultats indiqués aux figures 3A et 3B mettent en évidence le pourcentage d'une population cellulaire qui a subi la relocalisation de Bax à la mitochondrie suite à un traitement pharmacologique.

La figure 3A représente l'évolution dans le temps d'une population cellulaire traitée avec 20  $\mu$ M de selenite en l'absence (courbe D) et en présence (courbe E) d'un inhibiteur et avec 40 nM de staurosporine en l'absence et en présence du même inhibiteur B.

Grâce à cette technique, on observe que le cinétique d'activation de Bax n'est pas modifiée par l'inhibiteur lors du traitement avec le selenite, alors qu'au contraire cet inhibiteur est actif sur la staurosporine.

De même, l'histogramme de la figure 4 représente le pourcentage des cellules dans lesquelles Bax a été activée après traitement de 24 h avec 40 nM de staurosporine, 50  $\mu$ M de ceramide ou TNF 0,1 ng/ml en présence de cycloheximide, sous l'influence de rayonnements U.V.

Cette technique permet donc de distinguer les propriétés pro-apoptotiques de différents agents.

Elle présente de nombreux avantages par rapport aux techniques actuellement disponibles pour évaluer l'activation de Bax et sa relocalisation à la mitochondrie qui se base sur des fractionnements subcellulaires et des quantifications par Western Blot de la quantité de protéines Bax présentes dans les différentes fractions ou par immunofluorescence avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement la protéine qui a subi le changement conformationnel d'activation.

Par rapport à ces techniques, l'approche décrite précédemment ne nécessite qu'une manipulation expérimentale très réduite (le temps cumulé est inférieur à 30 min par rapport à 24 h pour les autres techniques) et elle permet la mesure du paramètre d'intérêt au sein même de la cellule sans induire d'artefacts liés au fractionnement ou à la fixation et à l'utilisation de détergents à doses élevées (immunofluorescence) et présente un coût expérimental minime.

### EXEMPLE 3 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CASPASE 3 AU COURS DE L'APOPTOSE

Les principaux effecteurs de l'apoptose sont les caspases, cystéines protéases caractérisées par une spécificité absolue pour un aspartate en position P1 dans leur site de clivage. Ces enzymes contiennent toutes une séquence pentapeptidique identique dans leur site actif et participent, avec d'autres protéases comme la calpaïne, aux nombreux événements protéolytiques qui ont lieu dans une cellule en apoptose, aboutissant au clivage de substrats protéiques jouant un rôle clé dans les fonctions cellulaires normales (protéines du cytosquelette, protéines nucléaires ou enzymes de réparation de l'ADN).

L'activation des caspases peut emprunter deux grandes voies. La première est la voie «mitochondriale», où la protéine Apaf-1 interagit avec la procaspase-9, en présence de dATP et de cytochrome c, libéré à partir de l'espace intermembranaire des



mitochondries, pour former «d'apoptosome», permettant ainsi l'activation de la caspase-9 (clivage auto catalytique de la procaspase-9) puis de la caspase-3. L'autre voie est celle des récepteurs de la superfamille des récepteurs du TNF sur la membrane plasmique. L'interaction de TNFR1 ou de Fas (CD95 ou APO-1) avec leur ligand naturel ou un anticorps monoclonal agoniste permet l'assemblage d'un complexe multiprotéique cytoplasmique appelé DISC (death-inducing signaling complex) et l'enclenchement de la cascade apoptotique par activation de la procaspase-8.

Il existe actuellement un nombre limité de méthodes qui ont déjà été mentionnées précédemment et dont aucune n'est parfaitement satisfaisante pour mesurer l'activation des caspases.

Dans le cadre de la présente invention, on utilise une nouvelle sonde recombinante utilisable en microscopie et en cytométrie pour mesurer l'activité des caspases dans les cellules apoptotiques.

Cette nouvelle sonde est constituée d'une protéine de fusion dans laquelle une protéine fluorescente quelconque, DsRed2 ou EGFP, est reliée par un court linker contenant le site de consensus de la caspase 3 à une séquence transmembranaire assurant l'ancrage spécifique de la sonde à la membrane externe mitochondriale.

La séquence correspondante est décrite dans SEQ ID N° 1.

La partie soulignée correspond au linker synthétique contenant la séquence de clivage pour la caspase 3, puis le domaine transmembranaire du cytochrome b5 muté auquel a été conféré une spécificité d'adressage mitochondrial.

Lors de l'induction de l'apoptose, la caspase 3 activée clive la séquence DEVD contenue dans le linker qui a été interposé entre la protéine fluorescente et la séquence transmembranaire. La GFP préalablement fixée devient une protéine soluble dans le cytosol de la cellule.

Le signal fixé dans les cellules dans lesquelles la caspase 3 n'est pas activée devient soluble dans les cellules dans lesquelles la caspase est activée.

Les cellules sont cultivées sur lamelles en verre et transfectées avec le vecteur décrit précédemment, elles sont montées sur une chambre d'incubation dans un milieu salin et observées au microscope à fluorescence. Avant ou pendant l'observation, elles sont traitées avec l'agent pro-apoptotique. L'activation de la caspase 3 et sa cinétique peuvent être mises en évidence par simple observation de la modification de la distribution intracellulaire du signal fluorescent qui, de mitochondrial, devient rapidement cytosolique une fois la caspase activée.

Mais il est plus commode de mesurer l'activation de la caspase par cytométrie en flux.

La population contrôle et la population traitée avec l'agent apoptotique sont détachées de leurs boîtes de culture par traitement à la trypsine, les cellules sont  
5 ensuite resuspendues dans une solution saline intracellulaire en présence de 50  $\mu\text{M}$  de digitonine, les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux et la fluorescence de la GFP est mesurée en canal FL1.

La technique présentée permet d'évaluer l'activation de la caspase 3 en mesurant le pourcentage de cellules dans lesquelles le clivage du capteur fluorescent a  
10 eu lieu.

Avec cette approche, il est donc possible :

- d'analyser si l'expression d'un gène induit ou non l'activation de la caspase 3 et
- d'évaluer de façon quantitative le pouvoir pro-apoptotique ou cytoprotecteur d'une  
drogue.

15 Ainsi, la figure 6 représente la quantification de l'action de la caspase 3 dans une population de cellules HeLa traitées avec différents inducteurs apoptotiques : irradiation UV (200  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ),  $\text{TNF}\alpha$  100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , staurosporine 1  $\mu\text{M}$  pendant 6 h et staurosporine 1  $\mu\text{M}$  en présence d'inhibiteur de caspases (ZVAD 50  $\mu\text{M}$ ).

En parallèle est représentée la quantification d'un autre paramètre  
20 apoptotique (la dépolymérisation mitochondriale qui dans ce modèle d'induction de l'apoptose dépend de l'activation des caspases).

Bien entendu, ce procédé est directement généralisable à l'ensemble des caspases et d'autres protéases qui peuvent être introduites dans des systèmes différents et pour lesquelles l'homme du métier saura réaliser le vecteur correspondant.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Ferri K.F., Kroemer G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat. Cell. Biol. 3(11):E255-63
- 5 2) Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N. (2000). Structure of Bax : coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell 10;103(4):645-54

## REVENDICATIONS

1) Procédé de mise en évidence de la survenue d'un évènement moléculaire particulier dans une cellule, caractérisé en ce que :

- 5    - on détecte la "solubilisation" d'une protéine marqueur "fixée" (respectivement la "fixation" d'une protéine marqueur "solubilisée") qui est un marqueur direct ou indirect de la survenue de l'évènement moléculaire particulier,
- laquelle protéine marqueur est présente dans la cellule avant la détection précédente,
- 10   - la cellule étant, avant la détection, soumise à une perméabilisation de la membrane plasmique qui libère la protéine solubilisée dans le milieu extracellulaire,
- la présence de la protéine marqueur étant alors détectée dans la cellule ou le milieu extracellulaire par tout moyen approprié, ce qui permet de déterminer si la solubilisation, respectivement la fixation, ont eu lieu et donc l'évènement
- 15   moléculaire correspondant.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la "fixation" cellulaire de la protéine correspond à un ancrage membranaire ou une compartimentation au niveau subcellulaire.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la solubilisation cellulaire de la protéine correspond à la présence de la protéine marqueur libre dans le cytosol.

4) procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant un fragment fluorescent.

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la protéine marqueur est produite dans la cellule par un vecteur d'expression.

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine marqueur est produite de façon constitutive par la cellule.

7) Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la solubilisation, respectivement la fixation, de la protéine fluorescente, sont détectées par cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence sur les cellules après perméabilisation de la membrane.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit au clivage ou au remaniement de la protéine marqueur et la solubilise.

## REVENDICATIONS

1) Procédé de mise en évidence de la survenue d'un évènement moléculaire particulier dans une cellule, caractérisé en ce que :

- 5    - on détecte la "solubilisation" d'une protéine marqueur "fixée" (respectivement la "fixation" d'une protéine marqueur "solubilisée") qui est un marqueur direct ou indirect de la survenue de l'évènement moléculaire particulier,
- laquelle protéine marqueur est présente dans la cellule avant la détection précédente,
- 10   - la cellule étant, avant la détection, soumise à une perméabilisation de la membrane plasmique qui libère la protéine solubilisée dans le milieu extracellulaire,
- la présence de la protéine marqueur étant alors détectée dans la cellule ou le milieu extracellulaire par tout moyen approprié, ce qui permet de déterminer si la solubilisation, respectivement la fixation, ont eu lieu et donc l'évènement
- 15    moléculaire correspondant.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la "fixation" cellulaire de la protéine est effectuée grâce à un ancrage membranaire de la protéine ou par compartimentation de la protéine au niveau subcellulaire.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la

20    solubilisation cellulaire de la protéine est obtenue par libération de la protéine marqueur dans le cytosol.

4) procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant un fragment fluorescent.

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la

25    protéine marqueur est produite dans la cellule par un vecteur d'expression.

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine marqueur est produite de façon constitutive par la cellule.

7) Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la solubilisation, respectivement la fixation, de la protéine fluorescente, sont détectées par

30    cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence sur les cellules après perméabilisation de la membrane.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit au clivage ou au remaniement de la protéine marqueur et la solubilise.

## REVENDICATIONS

1) Procédé de mise en évidence de la survenue d'un évènement moléculaire particulier dans une cellule, caractérisé en ce que :

- 5 - on détecte la "solubilisation" d'une protéine marqueur "fixée" (respectivement la "fixation" d'une protéine marqueur "solubilisée") qui est un marqueur direct ou indirect de la survenue de l'évènement moléculaire particulier,
- laquelle protéine marqueur est présente dans la cellule avant la détection précédente,
- 10 - la cellule étant, avant la détection, soumise à une perméabilisation de la membrane plasmique qui libère la protéine solubilisée dans le milieu extracellulaire,
- la présence de la protéine marqueur étant alors détectée dans la cellule ou le milieu extracellulaire par tout moyen approprié, ce qui permet de déterminer si la solubilisation, respectivement la fixation, ont eu lieu et donc l'évènement
- 15 moléculaire correspondant.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la "fixation" cellulaire de la protéine est effectuée grâce à un ancrage membranaire de la protéine ou par compartimentation de la protéine au niveau subcellulaire.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la solubilisation cellulaire de la protéine est obtenue par libération de la protéine

20 marqueur dans le cytosol.

4) procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant un fragment fluorescent.

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la

25 protéine marqueur est produite dans la cellule par un vecteur d'expression.

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine marqueur est produite de façon constitutive par la cellule.

7) Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la solubilisation, respectivement la fixation, de la protéine fluorescente, sont détectées par

30 cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence sur les cellules après perméabilisation de la membrane.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit au clivage ou au remaniement de la protéine marqueur et la solubilise.

9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit à l'apparition d'un fragment d'ancrage membranaire dans la protéine marqueur et à sa fixation ou à la compartimentation de la protéine marqueur.

5 10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation de Bax, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion Bax-protéine fluorescente, la protéine fluorescente étant fusionnée à l'extrémité N-terminale de Bax et en ce que, en cas d'activation de Bax la protéine Bax est fixée.

10 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation d'une protéase, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant le site de clivage de la protéase et, de part et d'autre, un site d'ancrage à la membrane et une protéine fluorescente et en ce que, lors de l'expression de la protéase, la protéine marqueur est solubilisée par clivage  
15 et libération de la protéine fluorescente.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la protéase est une caspase.

13) Protéine marqueur utile dans la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte un composant sensible  
20 qui subira la solubilisation (la fixation) et un composant indicateur permettant la détection.

14) Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine de fusion dont le composant indicateur est une protéine fluorescente.

15) Vecteur exprimant, dans un environnement cellulaire, une protéine  
25 marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

16) Cellule transformée exprimant une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

17) Cellule selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'expression de la protéine marqueur est stable.

30 18) Animal transgénique dont au moins un certain type de cellule exprime une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

19) Kit de mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit à l'apparition d'un fragment d'ancrage membranaire dans la protéine marqueur et à sa fixation ou à la compartimentation de la protéine marqueur.

5 10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation de Bax, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion Bax-protéine fluorescente, la protéine fluorescente étant fusionnée à l'extrémité N-terminale de Bax et en ce que, en cas d'activation de Bax la protéine Bax est fixée.

10 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation d'une protéase, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant le site de clivage de la protéase et, de part et d'autre, un site d'ancrage à la membrane et une protéine fluorescente et en ce que, lors de l'expression de la protéase, la protéine marqueur est solubilisée par clivage  
15 et libération de la protéine fluorescente.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la protéase est une caspase.

13) Protéine marqueur utile dans la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte une composante sensible  
20 qui subira la solubilisation (la fixation) et une composante indicateur permettant la détection.

14) Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine de fusion dont la composante indicateur est une protéine fluorescente.

15) Vecteur exprimant, dans un environnement cellulaire, une protéine  
25 marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

16) Cellule transformée exprimant une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

17) Cellule selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'expression de la protéine marqueur est stable.

30 18) Animal transgénique non humain dont au moins un certain type de cellule exprime une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

19) Kit de mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :



9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la survenue de l'évènement moléculaire conduit à l'apparition d'un fragment d'ancrage membranaire dans la protéine marqueur et à sa fixation ou à la compartimentation de la protéine marqueur.

5 10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation de Bax, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion Bax-protéine fluorescente, la protéine fluorescente étant fusionnée à l'extrémité N-terminale de Bax et en ce que, en cas d'activation de Bax la protéine Bax est fixée.

10 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'évènement moléculaire à détecter est l'activation d'une protéase, en ce que la protéine marqueur est une protéine de fusion comportant le site de clivage de la protéase et, de part et d'autre, un site d'ancrage à la membrane et une protéine fluorescente et en ce que, lors de l'expression de la protéase, la protéine marqueur est solubilisée par clivage  
15 et libération de la protéine fluorescente.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la protéase est une caspase.

13) Protéine marqueur utile dans la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte une composante sensible  
20 qui subira la solubilisation (la fixation) et une composante indicateur permettant la détection.

14) Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine de fusion dont la composante indicateur est une protéine fluorescente.

15) Vecteur exprimant, dans un environnement cellulaire, une protéine  
25 marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

16) Cellule transformée exprimant une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

17) Cellule selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'expression de la protéine marqueur est stable.

30 18) Animal transgénique non humain dont au moins un certain type de cellule exprime une protéine marqueur selon l'une des revendications 13 ou 14.

19) Kit de mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- des cellules transformées selon l'une des revendications 16 ou 17,
- un vecteur selon la revendication 15 ou
- un animal transgénique selon la revendication 18.

- des cellules transformées selon l'une des revendications 16 ou 17,
- un vecteur selon la revendication 15 ou
- un animal transgénique selon la revendication 18.

- des cellules transformées selon l'une des revendications 16 ou 17,
- un vecteur selon la revendication 15 ou
- un animal transgénique selon la revendication 18.

Figure 1

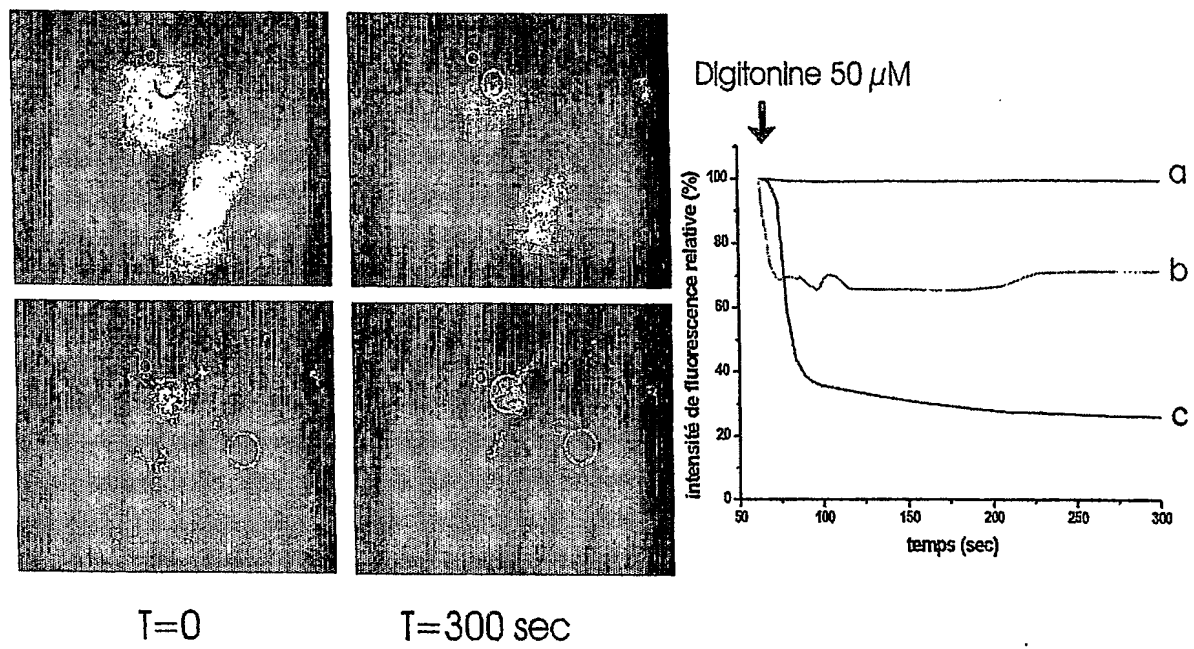


Figure 2

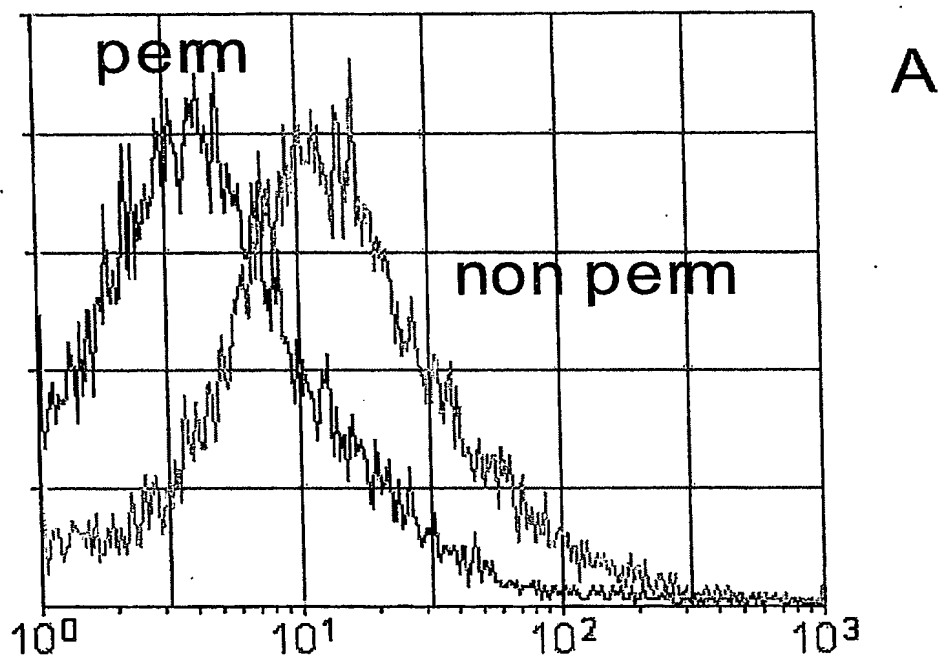


Figure 2

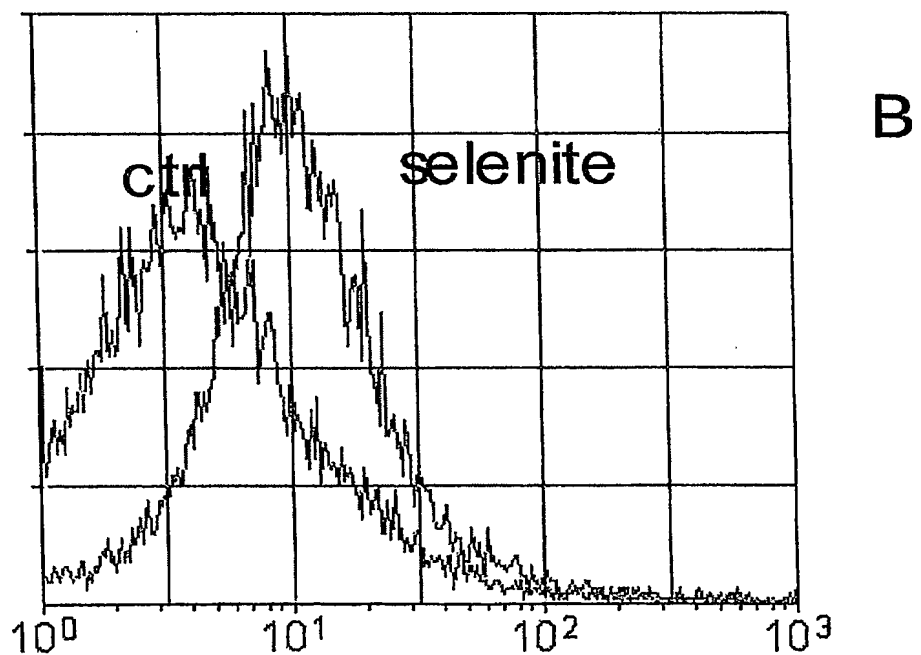
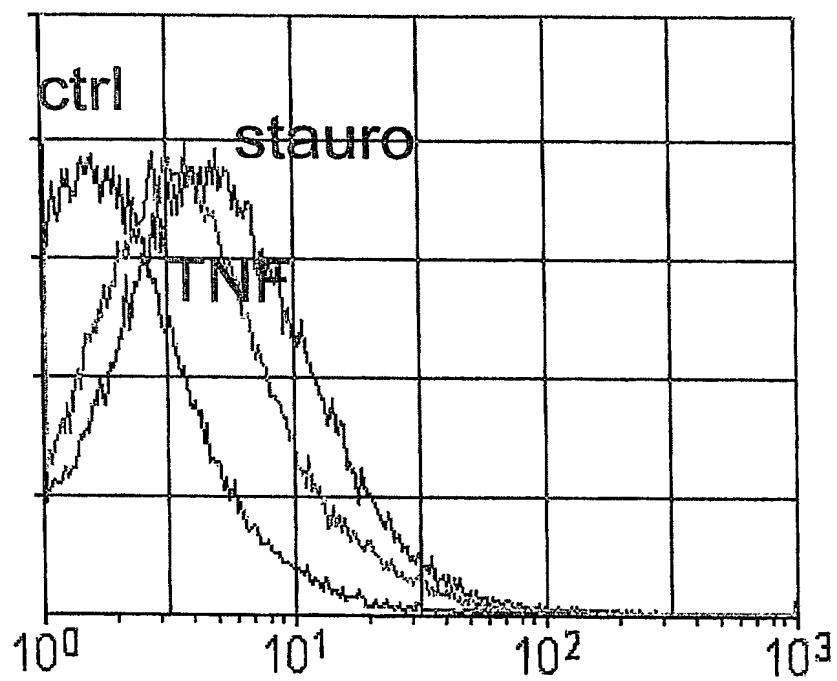


Figure 2



C

Figure 3 A

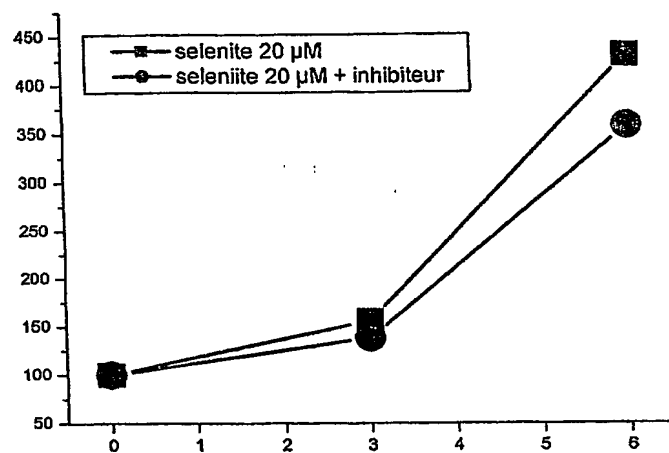


Figure 3 B

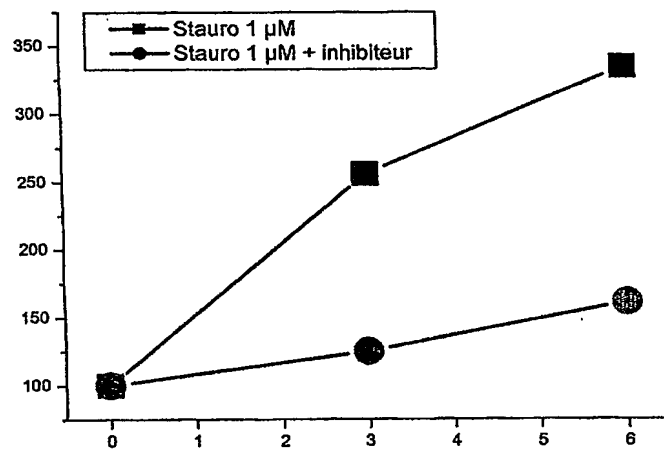




Figure 4

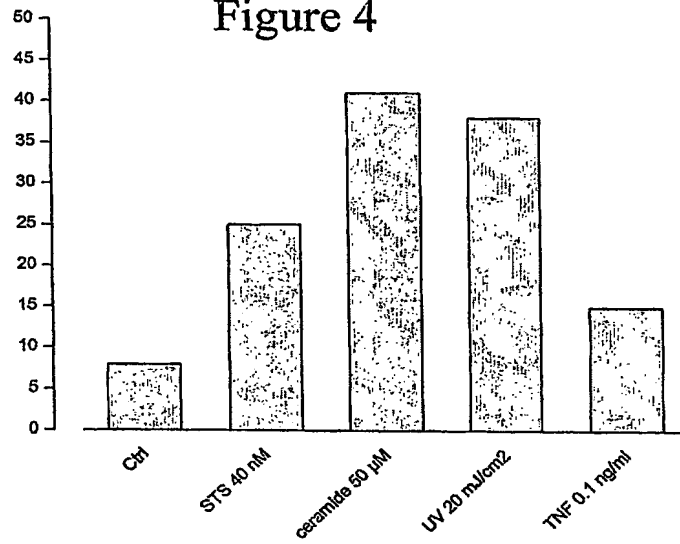


Figure 5

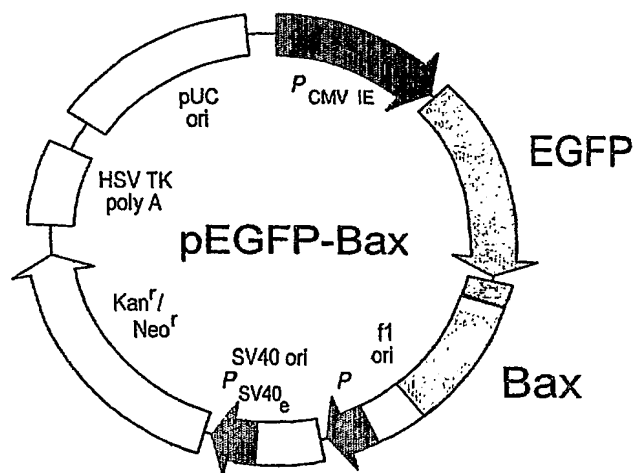
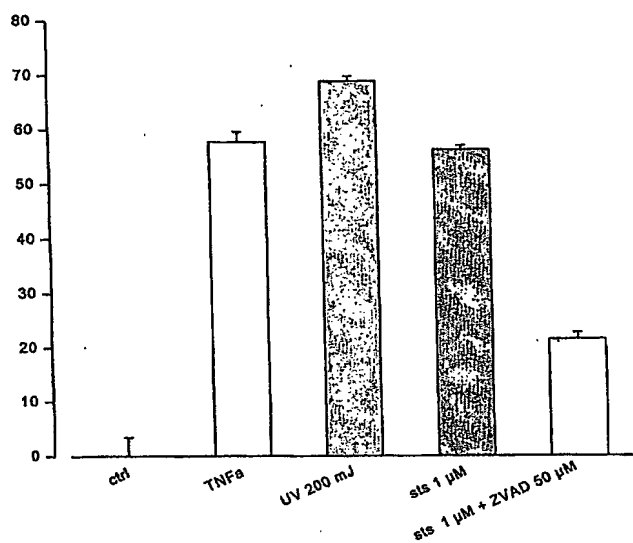


Figure 6



## SEQUENCE LISTING

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale -  
INSERM

<120> Procédé de mise en évidence d'un événement moléculaire dans une  
cellule grâce à des protéines marqueurs fluorescentes

<130> D20600

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 195

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(174)

<400> 1

gaa ggt gga gga ggt tca gat gaa gtc gat tca gga gga ggt gga tct	48
Glu Gly Gly Gly Gly Ser Asp Glu Val Asp Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	

gga ggt ggc gga tcc ttc gag ccg tcc gaa act ctg atc act acc gtt	96
Gly Gly Gly Gly Ser Phe Glu Pro Ser Glu Thr Leu Ile Thr Thr Val	
20 25 30	

gaa tcg aac tcg agt tgg tgg act aac tgg gtt atc cct gcg atc tct	144
Glu Ser Asn Ser Ser Trp Trp Thr Asn Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser	
35 40 45	

gct ctg gtt gta gcg ctg atg tac ccg cgt taatgactgc agtctagagg g	195
Ala Leu Val Val Ala Leu Met Tyr Arg Arg	
50 55	

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde

<400> 2

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Asp Glu Val Asp Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	

Gly Gly Gly Gly Ser Phe Glu Pro Ser Glu Thr Leu Ile Thr Thr Val	
20 25 30	

Glu Ser Asn Ser Ser Trp Trp Thr Asn Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser  
35 40 45

Ala Leu Val Val Ala Leu Met Tyr Arg Arg  
50 55

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.../3...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		240034 JW
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0308 136
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
<p>PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN EVENEMENT MOLECULAIRE DANS UNE CELLULE GRACE A DES PROTEINES MARQUEURS FLUORESCENTES.</p>		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
<p>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) : 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS- FRANCE</p>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	ICHAS François
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		104, avenue de Candau
		Code postal et ville
		L 33600 RESSAC FR
	Société d'appartenance (facultatif)	
<b>2</b>	Nom	DE GIORGI ICHAS Francesca
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		104, avenue de Candau
		Code postal et ville
		L 33600 RESSAC FR
	Société d'appartenance (facultatif)	
<b>3</b>	Nom	PIAZZA Pier Vincenzo
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		20, rue Père Louis de Jabrun
		Code postal et ville
		L 33000 BORDEAUX FR
	Société d'appartenance (facultatif)	
<p>S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.</p>		
<p><b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)</p>		

*[Signature]* 04.07.2003  
911253

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° .../...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0308 186

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN EVENEMENT MOLECULAIRE DANS UNE CELLULE GRACE A DES PROTEINES MARQUEURS FLUORESCENTES.

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**


INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) : 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS FRANCE

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

<b>1</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	DESSOLIN Jean
	Code postal et ville	33700 MERIGNAC FR
Société d'appartenance (facultatif)		33700 MERIGNAC FR
<b>2</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	SCHEMBRI Laura
	Code postal et ville	33400 TALENCE FR
Société d'appartenance (facultatif)		33400 TALENCE FR
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	TOMASELLO Flora
	Code postal et ville	33400 TALENCE FR
Société d'appartenance (facultatif)		33400 TALENCE FR

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)  
DU (DES) DEMANDEUR(S)  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)**

 04.07.1003  
4125)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° .../...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

3 3



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0308186
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
<p>PROCÉDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN EVENEMENT MOLECULAIRE DANS UNE CELLULE GRACE A DES PROTEINES MARQUEURS FLUORESCENTES.</p>		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
<p>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) : 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS-FRANCE</p>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	LARTIGUE Lydia
	Code postal et ville	223, avenue République
Société d'appartenance (facultatif)		33700 MERIGNAC FR
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<p><b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)</p> <p>04.07.2013</p> <p>91251</p>		

PCT/FR2004/001678





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**